

ГАРИПОВ АЗАТ РОБЕРТОВИЧ

**РЕГУЛЯЦИЯ ГИСТОНМЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ EZH2 В КЛЕТКАХ  
ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ ЧЕЛОВЕКА**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2016

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии КФУ Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей патологии ГБУ ВПО "Казанский государственный медицинский университет" Бойчук Сергей Васильевич (г. Казань)

доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии ФГБУ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Гоголев Юрий Викторович (г. Казань)

Ведущая организация: ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится 28 апреля 2016 года в 13:00 на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседания ученого совета

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «          » 2016 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

З. И. Абрамова

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.**

Каждый год в мире регистрируется 12,7 миллионов новых случаев рака, из которых больше 1 миллиона приходится на гинекологические формы рака [Jemal et al., 2011]. Согласно данным международного агентства исследования рака (International Agency for Research on Cancer, 2008) эпителиальный рак яичников (ЭРЯ) является четвертой наиболее часто встречающейся причиной смертности от рака среди женщин в мире.

Гистопатология эпителиальных опухолей яичников неоднородна: каждый подтип ЭРЯ содержит изменения экспрессии генов, эпигенетические изменения, генетические мутации, которые все чаще оцениваются на предмет их способности являться целевыми мишенями молекулярных методов лечения и обуславливать эффективность последних. Таким образом, поиск новых доступных целей для терапии ЭРЯ является крайне актуальной темой современной онкологии. В последнее время, появилось множество публикаций, сообщающих о критической роли гистонметилтрансферазы EZH2 в прогрессии онкологических заболеваний самых разных локализаций. Большинство опубликованных работ исследовали влияние уровня экспрессии EZH2 на рост и характеристики культур раковых клеток *in vitro*, в ксенографтах, а также анализировали ретроспективные данные.

В данной работе был использован новый подход. Впервые был поставлен вопрос, как именно регулируется экспрессия EZH2. В большинстве существующих работ для изучения роли EZH2 использовали нокдаун или сайленсинг гена EZH2, но не специфическое ингибирование активности гистонметилтрансферазы EZH2. Для исследования влияния активности EZH2 на рост и характеристики клеток ЭРЯ мы использовали новый S-аденозилметионин конкурентный ингибитор активности EZH2 – GSK343. Такой подход позволил исключить побочные эффекты нокдауна EZH2, и сфокусироваться на оценке важности его функции эпигенетической регуляции в клетках ЭРЯ.

В соответствии с вышеизложенным, в данной работе была поставлена следующая **цель**: выявить и охарактеризовать регуляторный механизм экспрессии

гена гистонметилтрансферазы EZH2 и её активности в клетках эпителиального рака яичников.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Определить уровень экспрессии EZH2 в клеточных линиях эпителиального рака яичника SKOV3, OVCAR-5, PEO1 и нормальных клетках эпителия яичника.
- 2) Создать репортерные конструкции на основе гена люциферазы для определения активности промотора гена EZH2 в клеточных линиях эпителиального рака яичников и охарактеризовать сайты связывания регуляторов транскрипции гена EZH2.
- 3) Определить уровень экспрессии NF-YA биоинформационными, биохимическими и иммуногистохимическими методами в нормальных и опухолевых клетках эпителия яичника и подтвердить связывание NF-YA с идентифицированной последовательностью промотора гена EZH2.
- 4) Выявить регуляторные эффекты нокдауна NF-YA в культурах опухолевых клеток яичника и ксенографтных моделях иммунодефицитных мышей.
- 5) Установить влияние ингибитора активности EZH2 на клетки эпителиального рака яичников в двумерных и трехмерных условиях роста и охарактеризовать цитотоксичность РНКазы *B. pumilus* (биназы) по отношению к клеткам рака яичника SKOV3 и OVCAR5 в сравнении с нормальными клетками эпителия яичника.

**Научная новизна.** В данной работе был впервые исследован механизм регуляции экспрессии гена EZH2. Показано, что за гиперэкспрессию EZH2 отвечает не амплификация гена, а регуляция транскрипционным фактором NF-Y. Установлено, что в ЭРЯ NF-YA связывается с двумя ССААТ сайтами в проксимальной части промотора EZH2. Впервые показана положительная корреляция экспрессии *NFYA* и *EZH2*, а также установлено, что высокий уровень *NFYA* прогнозирует низкую выживаемость среди пациентов с ЭРЯ. При этом было впервые описано, что подавление экспрессии NF-YA снижает экспрессию

EZH2 и вызывает апоптоз клеток ЭРЯ *in vitro* и в ксенографтах мышей. Было установлено, что ингибирование триметилирования лизина 27 гистона H3 вызывает апоптоз в клетках ЭРЯ, но не в двумерной, а только в трёхмерной структуре (матригеле), что имеет принципиальное значение для тестирования новых препаратов на основе ингибиторов EZH2 и перспектив разработки эффективных терапевтических агентов. Также впервые показано селективное действие РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) в отношении клеток ЭРЯ в сравнении с нормальными клетками эпителия яичника.

**Теоритическая и практическая значимость работы.** Полученные результаты вносят значительный вклад в дальнейшее исследование гистонметилтрансферазы EZH2 и ее роли в онкогенезе. Новая информация о механизме регуляции EZH2 делает возможным разработку альтернативных методов ингибирования активности EZH2. Показанная корреляция между EZH2 и NF- $\kappa$ B предоставляет возможность разработки новых терапевтических средств для лечения эпителиального рака яичников.

Установленная впервые разница в эффективности действия ингибитора активности EZH2 в двумерных и трёхмерных условиях роста обуславливает необходимость пересмотра постановки множества существующих экспериментов на культурах клеток. Продемонстрированная эффективность действия селективного ингибитора активности гистонметилтрансферазы EZH2 (GSK343) и РНКазы *Bacillus pumilus* в отношении клеток ЭРЯ открывает новые горизонты для дальнейшего исследования данных препаратов и внедрения в лечебную практику.

**Методология и методы исследования.** Поставленные задачи были решены с применением биохимических, микробиологических, молекулярно-биологических и генетических методов исследования (полимеразная цепная реакция, электрофорез, проточная цитометрия, иммуноблоттинг, ксенографты, иммунофлуоресценция и другие методы). Результаты исследования обработаны общеизвестными математическими методами статистики.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- 1) В промоторной области гена гистонметилтрансферазы *EZH2*, экспрессия которого повышена в клетках эпителиального рака яичников, выявлены сайты, ответственные за связывание с транскрипционным активатором NF-Y, необходимым для активации экспрессии гена *EZH2*.
- 2) В нормальных и опухолевых эпителиальных тканях яичника методами иммуногистохимии, молекулярной биологии и биоинформационными методами установлена прямая корреляция экспрессии регуляторной субъединицы А транскрипционного активатора NF-Y (NF-YA) и гистонметилтрансферазы *EZH2*.
- 3) Апоптоз клеток эпителиального рака яичников индуцируется при нокдауне регуляторной субъединицы NF-YA, подавлении активности метилирования лизина 27 гистона H3 белком *EZH2*, а также при обработке клеток экзогенной РНКазой *Bacillus pumilus* (биназой).

**Достоверность результатов** проведенных исследований подтверждается значительным объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и проанализированных с использованием современных высокоточных приборов, а также опубликованием полученных результатов в международных журналах с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Полученные в рамках диссертационной работы результаты и сформулированные на их основе заключение и положения, выносимые на защиту, **являются новым крупным научным достижением в области биохимии; в диссертационной работе также решена научная проблема, имеющая важное значение в лечении онкологических заболеваний.**

**Апробация работы.** Основные результаты исследований доложены на следующих конференциях: ежегодные конференции студентов и аспирантов онкологического научно-исследовательского центра Fox Chase (Филадельфия, США, 2010-2012); на ежеквартальных конференциях аспирантов института Wistar

(Филадельфия, США, 2012-2013); а также на ежегодных отчетных сессиях спонсорского комитета (Филадельфия, США, 2010-2013).

**Место выполнения работы и личный вклад соискателя.** Работа выполнена на кафедре микробиологии и в лаборатории Биосинтеза и биоинженерии ферментов Казанского федерального университета в рамках Программы Министерства образования и науки Российской Федерации по повышению конкурентоспособности Казанского федерального университета. Часть экспериментов поставлена на базе онкологического научно-исследовательского центра Fox Chase Cancer Center и института Wistar (Филадельфия, США) в рамках грантов NIH RO1CA1633777 и DOD OC093420. Соискателем самостоятельно осуществлена постановка всех экспериментальных исследований, написан обзор литературы и выполнен анализ собственных результатов. Обсуждение результатов, касающихся медицинских аспектов ингибирования *EZH2* для создания перспективных методов терапии рака яичников, проведено при участии доктора Rugang Zhang и доктора Maureen Murphy, являющихся кураторами стажировки соискателя в онкологическом научно-исследовательском центре Fox Chase и институте Wistar.

**Связь работы с научными программами.** Исследования поддержаны Программой Министерства образования и науки Российской Федерации по повышению конкурентоспособности Казанского федерального университета и грантами Российского научного фонда №14-14-00522 и Российского Фонда Фундаментальных исследований № 12-04-01226-а.

Часть экспериментальной работы осуществлена при грантовом финансировании стажировки соискателя в онкологическом научно-исследовательском центре Fox Chase Cancer Center и институте Wistar (гранты NIH RO1CA1633777 и DOD OC093420).

**Публикация результатов исследования.** По теме работы опубликовано 4 статьи в международных журналах (суммарный импакт-фактор 39,1), включенных в базы Scopus и WOS, и 2 тезиса докладов научных конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 96 страницах машинописного текста, включает 36 рисунков и 5 таблиц. Библиография включает 143 наименований.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Материалы.** Ингибитор активности EZH2. В качестве ингибитора активности гистонметилтрансферазы EZH2 использовали GSK343 полученный через Structure Genomics Consortium SGC M5G1L7 (Торонто, США). GSK343 является S-аденозилметионин (SAM) конкурентным ингибитором. GSK343 растворяли в ДМСО в концентрации 5 мМ и далее разводили до соответствующих концентраций и добавляли к культурам клеток. Конечная концентрация ДМСО в питательной среде равнялась 0,01%.

Биназа Bacillus pumilus. Биназа была изолирована из культуры Bacillus pumilus. Очистка фермента проводилась по методике, которая была описана ранее [Makarov et al., 1993]. Фермент растворяли в используемой питательной среде.

Клеточные линии. Клеточные линии эпителиальных клеток яичника человека HOSE (Human Ovarian Surface Epithelium) были получены от двух здоровых доноров методом, описанным ранее [Bellacosa et al., 2008] отделением клеточных культур Fox Chase Cancer Center (Филадельфия, США). Данные клеточные линии выращивали в специально подобранной питательной среде (DMEM, 4% ЭТС, ITS 1-кратный, 100мкМ L-глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина, 50мкг/мл стрептомицина). Клеточные линии эпителиального рака яичника PEO1, SKOV3, OVCAR-5, UPN289, OVCAR-3, OVCAR-10 были предоставлены лабораторией Л. Гамильтона (Fox Chase Cancer Center, США).

Ксенографты. Для ксенографтных исследований использовали атимусные иммунодефицитные самки мышей, генотип *a/a Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup>* (The Jackson



Laboratory, США). Протокол эксперимента получил предварительное одобрение комитета IACUC (Institutional Care and Use Committee, США).

Базы данных. Для анализа экспрессии генов *EZH2* и *NFYA* использовали базу данных GEO, профиль GSE18521 (Gene Expression Omnibus; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Профиль GSE18521 включает в себя данные экспрессии набора генов 53 образцов высокодифференцированных серозных ЭРЯ и 10 индивидуальных образцов первичных нормальных клеток эпителия яичника (HOSE).

Методы. Люциферазный репортерный анализ промотера. Соответствующие фрагменты проксимального региона промотера человеческого гена *ezh2* клонировали в люциферазную репортерную плазмиду pGL2-Basic (Promega, США). Полученные конструкции секвенировали в отделении секвенирования Fox Chase Cancer Center (Филадельфия, США) для исключения ошибок на этапах клонирования. Используя реагент Lipofectamine® 2000 производилась трансфекция 1 мкг полученных плазмид и контрольной PGL2-Basic в исследуемые клеточные линии ЭРЯ согласно рекомендациям производителя (Life Technologies, США). Для контроля эффективности трансфекции исследуемых плазмид параллельно с ними трансфецировали плазмиду pCMV-beta-gal (Clontech, США). Люциферазную активность измеряли на люминометре GloMax® (Promega, США),  $\beta$ -галактозидазная активность измерялась на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio Rad, США) при длине волны 420 нм. Конечные значения люциферазной активности корректировали относительно  $\beta$ -галактозидазной активности.

Иммунопреципитация хроматина (ChIP). Иммунопреципитацию хроматина проводили с использованием набора ChIP Assay Kit (Millipore, США) на основе агарозных частиц, согласно рекомендациям производителя. Для ChIP метода использовали клеточные линии ЭРЯ SKOV3, PEO1, OVCAR-5, и нормальные клетки HOSE. Клетки фиксировали в 1% растворе формальдегида, далее подвергали лизису и выделяли геномную ДНК. Полученную ДНК резали ультразвуковым аппаратом (Hielscher, Германия) на участки размером 300-600 пар оснований, что проверялось методом электрофореза. Разрезанный хроматин

инкубировали с антителами anti-NFYA (Santa Cruz, США), anti-p300 (Santa Cruz, США), anti-EZH2 (BD Biosciences, США), anti-histone H3 (Millipore, США), anti-acetylated histone H3 (Millipore, США) в течение 14 часов при 4°C. Экстракцию ДНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции, после чего иммунопреципитированную ДНК амплифицировали методом ПЦР.

Определение апоптоза методом Guava Nexin®. Для определения апоптоза в исследуемых клеточных линиях ЭРЯ использовали реагент Guava Nexin® (Millipore, США) и проточный цитометр Guava easyCyte™ (Millipore, США). Клетки ресуспендировались в питательной среде RPMI-1640 и смешивались с реагентом Guava Nexin®, после чего анализировались на проточном цитометре Guava easyCyte™, используя встроенное программное обеспечение.

Культивирование клеток в матрикеле в трехмерных условиях. Клетки ЭРЯ высевали на 12-ти луночные пластиковые чашки с 120мкл матрикеля или без, с добавлением 1 мкМ GSK343 или 0.1% DMSO в качестве контроля. Для изоляции клеток из матрикеля использовали обработку холодным трипсином в течение 10 минут, после чего клетки ресуспендировались с при помощи пипетки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1.1 EZH2 регулируется на транскрипционном уровне в клетках ЭРЯ человека

Ранее было показано, что EZH2 гиперэкспрессирован в клетках эпителиального рака яичников (ЭРЯ) [Li et al., 2010]. Чтобы определить, на каком уровне происходит регуляция экспрессии EZH2, был проведен количественный ПЦР-анализ уровня мРНК EZH2 в клеточных линиях ЭРЯ человека и нормальных клетках поверхностного эпителия яичников человека (HOSE). Экспрессия мРНК *EZH2* в клетках ЭРЯ (PEO1, SKOV3, OVCAR-5) оказалась значительно выше в сравнении с клетками HOSE (Рисунок 1).

Гиперэкспрессия EZH2 может быть обусловлена амплификацией гена в некоторых типах рака, например таких как рак груди и предстательной железы

[Bracken et al., 2003]. Несмотря на это, согласно данным информационной базы TCGA, амплификация *EZH2* (>4 копий) встречается очень редко в ЭРЯ (~2%) [The Cancer Genome Atlas Research Network, 2011]. Благодаря полученным данным был сделан вывод, что гиперэкспрессия *EZH2* возможно регулируется на транскрипционном уровне в клетках ЭРЯ человека. Замена одной пары оснований в найденных ССААТ сайтах (на ССААС) в проксимальной части промотора, вызывало резкое снижение активности промотора *EZH2* в клетках ЭРЯ (Рисунок 2).

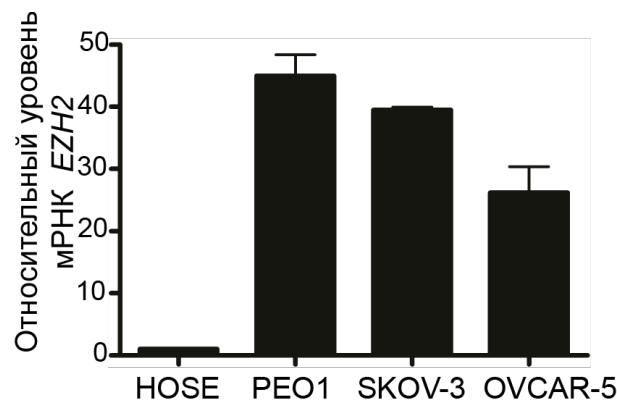


Рисунок 1. Экспрессия мРНК *EZH2* в клетках ЭРЯ и HOSE. Уровень экспрессии мРНК *EZH2* в нормальных клетках HOSE условно принят за 1 единицу.

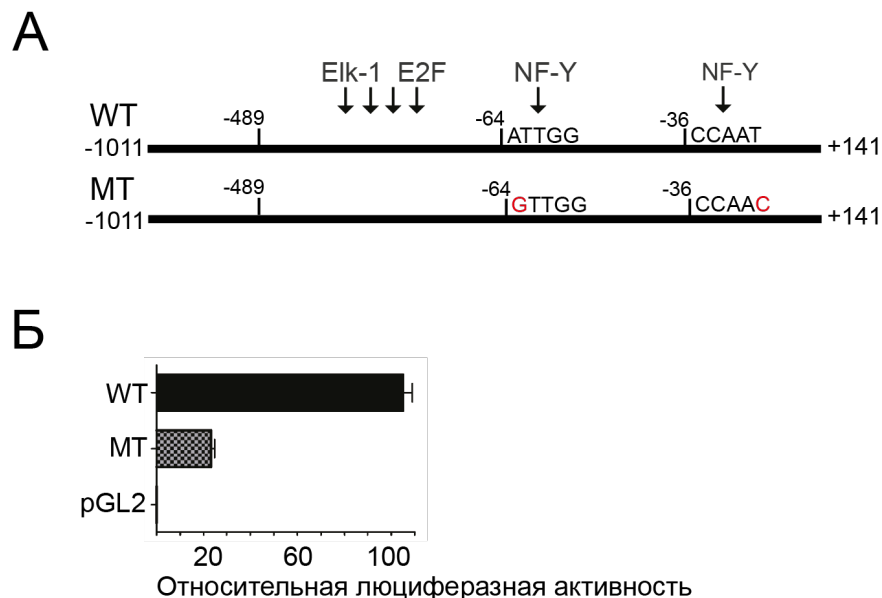


Рисунок 2. Люциферазный репортерный анализ активности промотора *EZH2* дикого (WT) и мутантного (MT) типа. А- схематическое изображение промотора *EZH2* дикого (WT) и мутантного (MT) типа. Красным цветом отмечены мутантные нуклеотиды. Стрелками указаны сайты связывания обозначенных транскрипционных факторов.

На основе полученных результатов было сделано заключение, что 2 ССААТ сайта в проксимальной части промотора *EZH2* играют основную роль в регуляции транскрипционной активности гена *EZH2* человека в клетках ЭРЯ.

## 1.2 NF-YA высоко экспрессирован в клетках ЭРЯ человека и индуцирует экспрессию *EZH2*

Как известно, NF-Y – это транскрипционный фактор, специфично связывающийся с сайтом ССААТ [Mantovani, 1998]. Поэтому было решено проверить уровень экспрессии NF-YA - регуляторной субъединицы комплекса NF-Y [Mantovani, 1999], в клетках ЭРЯ человека. Действительно, оказалось, что NF-YA гиперэкспрессирован в клетках ЭРЯ, в сравнении с нормальными клетками HOSE (Рисунок 3). Используемое антитело детектировало короткую и длинную изоформы NF-YA. Соответственно экспрессии NF-YA, гистонметилтрансфераза *EZH2* и маркер ее активности – триметилированный H3K27, так же были гиперэкспрессированы в клетках ЭРЯ (Рисунок 3А).

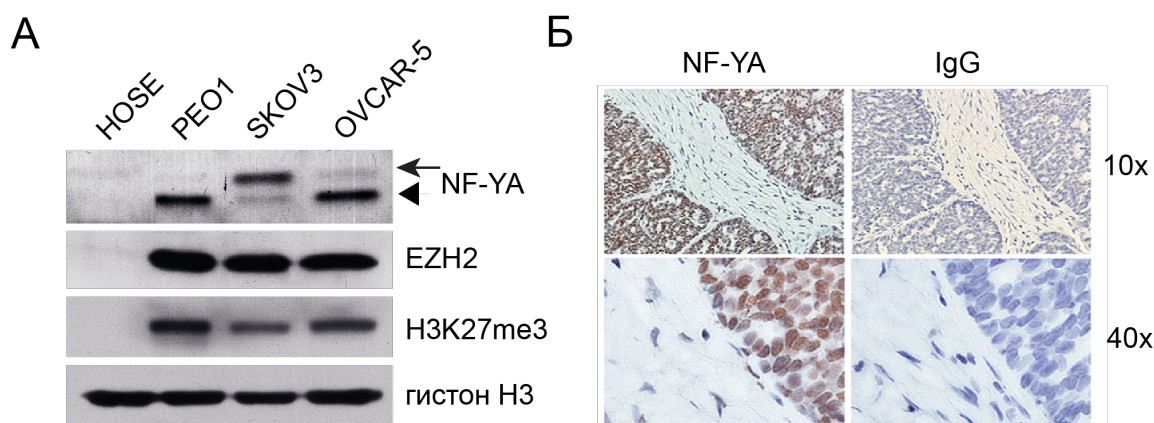


Рисунок 3. Экспрессия NF-YA в клетках ЭРЯ. А - Вестерн-блот клеток ЭРЯ (PEO1, SKOV3, OVCAR-5) и нормальных клеток HOSE. Стрелки указывают на короткую и длинную изоформы NF-YA. В качестве контрольного маркера использовался гистон H3. Б – Иммуногистохимический анализ образцов ткани ЭРЯ на экспрессию NF-YA.

### 1.3 Экспрессия NF-YA положительно коррелирует с экспрессией EZH2 в клетках ЭРЯ человека и прогнозирует более короткую выживаемость у пациентов

Благодаря полученным результатам из экспериментов на клеточных культурах было решено изучить корреляцию экспрессии *NFYA* и *EZH2* в образцах ткани ЭРЯ high grade (высокой степени злокачественности), полученных путем лазерной захватывающей микродиссекции. Для этого использовалась опубликованная база данных, в которой представлены профили экспрессии генов 53 образцов ЭРЯ high grade и 10 индивидуальных изолятов нормальных клеток HOSE [Mok *et al.*, 2009]. Экспрессия *NFYA* оказалась значительно выше в образцах ЭРЯ, в сравнении образцами клеток HOSE (Рисунок 4А). В соответствии с опубликованными ранее данными [Li *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010] экспрессия *EZH2* так же оказалась повышена в образцах ЭРЯ, в сравнении с образцами клеток HOSE (Рисунок 4Б).

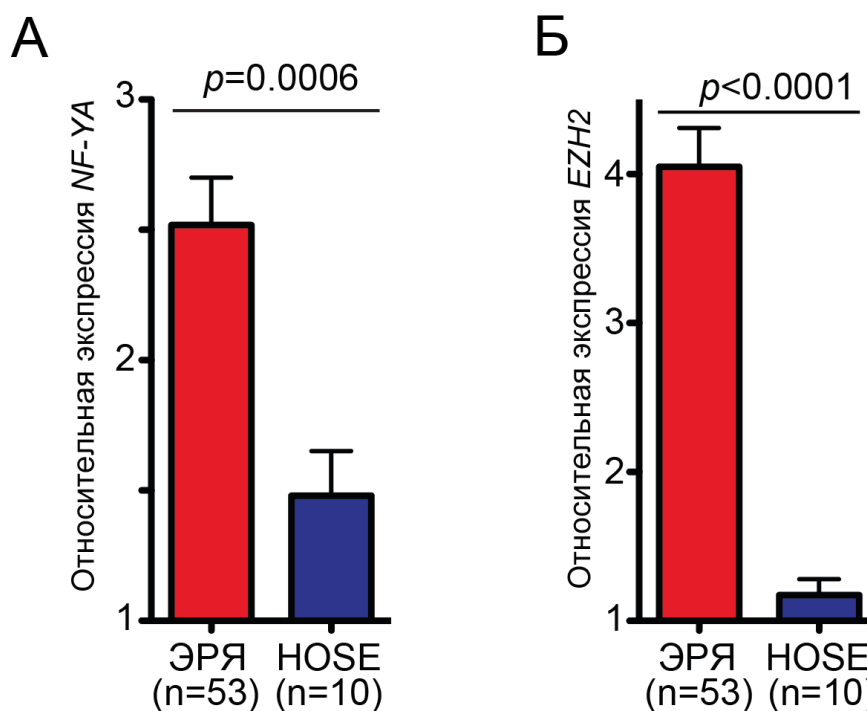


Рисунок 4. Экспрессия генов 53 образцов ЭРЯ high grade и 10 индивидуальных изолятов нормальных клеток HOSE. А – экспрессия *NFYA*. Б - экспрессия *EZH2*.

Корреляционный анализ методом Спирмена (коэффициент ранговой корреляции Спирмена) выявил положительную корреляцию между экспрессией

*NFYA* и *EZH2*, как при анализе только образцов ЭРЯ, так и при анализе образцов ЭРЯ с нормальными образцами HOSE вместе. Коэффициент корреляции в образцах только ЭРЯ равен 0.56, а при анализе образцов ЭРЯ вместе с образцами нормальных клеток HOSE – 0.64.

Следующее, что было решено проверить – это потенциальную связь между экспрессией *NFYA* и выживаемостью пациентов с ЭРЯ. Образцы из той же базы данных [Mok *et al.*, 2009] были разделены по уровню медианы экспрессии *NFYA* на высокий ( $n=26$ ) и низкий ( $n=27$ ). Было обнаружено, что высокий уровень экспрессии *NFYA* прогнозирует более короткую выживаемость у пациентов с ЭРЯ (Рисунок 5).

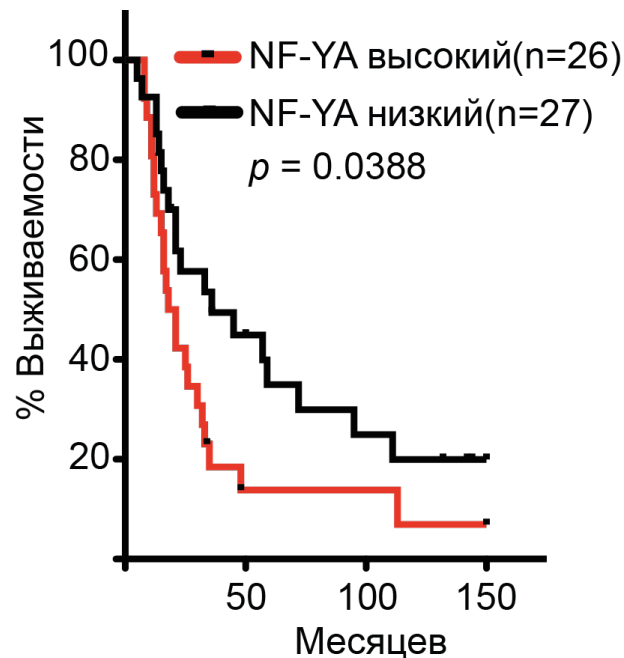


Рисунок 5. Анализ выживаемости пациентов с ЭРЯ на основе уровня экспрессии *NFYA*. Красная линия – пациенты с высоким уровнем экспрессии *NFYA*; черная линия - пациенты с низким уровнем экспрессии *NFYA*.

#### 1.4 Нокдаун NF-YA подавляет экспрессию *EZH2* и ингибирует рост клеток ЭРЯ человека

Полученные результаты показали, что NF-YA связывается с промотором *EZH2* и активирует его экспрессию в клетках ЭРЯ человека. Следовательно, подавление экспрессии NF-YA должно привести к снижению экспрессии *EZH2*. Чтобы проверить это предположение были использованы лентивирусы

кодирующие три индивидуальных коротких шпильковых РНК к человеческому гену *NFYA* (shNF-YA). Оценка эффективности нокдауна *NFYA* проводилась при помощи вестерн блота (Рисунок 6). Две из используемых shNF-YA (shNF-YA1, shNF-YA2) продемонстрировали эффективный нокдаун экспрессии *NFYA* в клеточной линии ЭРЯ SKOV3. shNF-YA3 не продемонстрировала нокдауна NF-YA и была использована как отрицательный контроль. При подавлении экспрессии NF-YA так же подавлялась экспрессия EZH2 и маркера ее активности – H3K27me3 (Рисунок 6).

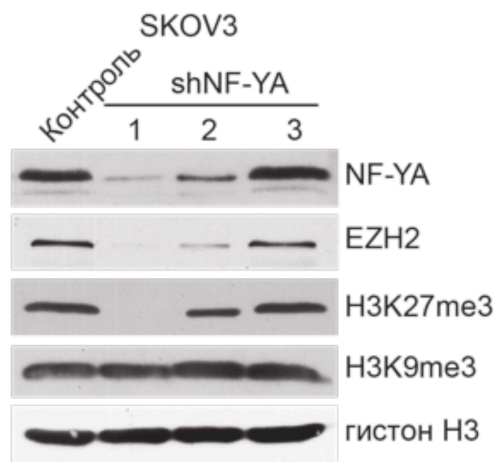


Рисунок 6. Вестерн блот клеточной линии ЭРЯ SKOV3. Используемые лизаты клеток прошли селекцию после инфицирования лентивирусами, кодирующими shNF-YA или контроль.

Экспрессия EZH2 коррелирует с экспрессией маркеров клеточной пролиферации [Li *et al.*, 2010]. Нокдаун NF-YA ингибирует экспрессию EZH2 (Рисунок 6), поэтому было решено проверить эффективность подавления роста опухоли, используя shNF-YA, *in vivo* в ксенографтной модели. Для ксенографтной модели использовались атимусные (голые) мыши и клеточная линия ЭРЯ SKOV3. Был получен результат, сходный с полученными результатами *in vitro*: shNF-YA, успешно подавляющие экспрессию NF-YA, ингибировали рост ксенографтных опухолей (Рисунок 7). Таким образом можно сделать вывод, что нокдаун NF-YA ингибирует рост ЭРЯ человека *in vivo* в ксенографтной модели.

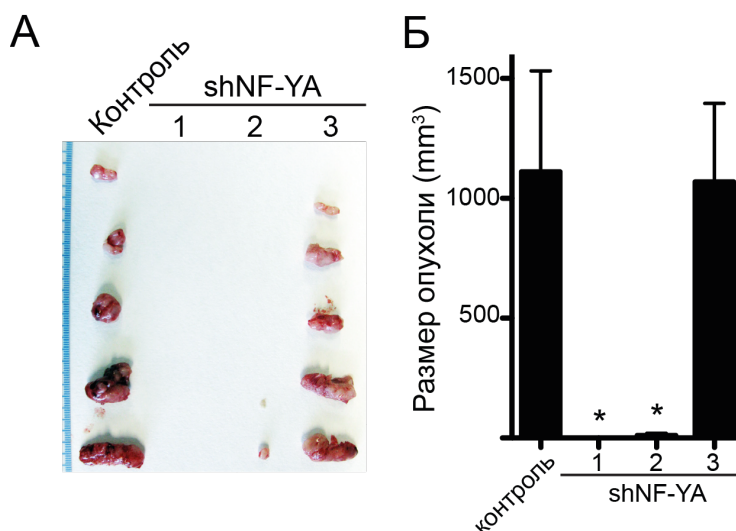


Рисунок 7. Ксенографтные опухоли ЭРЯ после нокдауна *NFYA* указанными shNF-YA. А- Фотография опухолей. Б – Средний объем опухолей  $*P < 0.05$

### 1.6 Нокдаун NF-YA вызывает апоптоз клеток ЭРЯ человека

Так как NF-YA регулирует экспрессию EZH2 (Рисунок 6), и нокдаун EZH2 вызывает апоптоз [Li *et al.*, 2010], было решено оценить влияние NF-YA на апоптоз в клетках ЭРЯ человека. Результаты показали увеличение маркеров апоптоза в клетках ЭРЯ после нокдауна NF-YA. Один из таких маркеров – аннексин-V, был увеличен до 69% в клетках ЭРЯ на четвертый день после нокдауна NF-YA.

Благодаря результатам нашей работы можно предположить, что подавление активности NF-YA может являться альтернативной стратегией для ингибирования EZH2 в клетках ЭРЯ и что NF-YA является перспективной мишенью для разработки терапевтических средств. Также будет интересно оценить эффект известных ингибиторов транскрипционного фактора NF-Y, например GWL-78 [Kotecha *et al.*, 2008], на злокачественные фенотипы клеток ЭРЯ человека.

### 1.7 Ингибирование активности EZH2 в клетках ЭРЯ не подавляет их пролиферацию в двумерных условиях роста

Ранее было показано, что подавление экспрессии EZH2 вызывает супрессию пролиферации клеток ЭРЯ и подавление роста опухоли ЭРЯ в ксенографтных моделях [Li *et al.*, 2010]. Известно, что основной функцией EZH2



является триметилирование лизина 27 гистона H3 (H3K27me3). Поэтому было необходимо оценить влияние активности EZH2 на пролиферацию клеток ЭРЯ. Для этого использовался специфический ингибитор активности EZH2 – GSK343, который является конкурентным ингибитором S-аденозилметионина.

Чтобы оценить влияние GSK343 на пролиферацию клеток ЭРЯ, было решено использовать клеточные линии ЭРЯ с высоким уровнем экспрессии EZH2 – SKOV3, OVCAR10, UPN289 в стандартных двумерных (2D) условиях роста. Клетки обрабатывались 1 мкМ GSK343 или DMSO в течение 12 дней с обновлением среды и добавлением ингибитора каждые 3 дня. Результаты показали снижение пролиферации клеток OVCAR10, обработанных GSK343, в 12-ти-дневный период, но при этом пролиферация клеток SKOV3 и UPN289 осталась на прежнем уровне (Рисунок 8), несмотря на эффективное подавление H3K27me3. Таким образом, можно сделать вывод, что GSK343 имеет ограниченный эффект на пролиферацию клеток ЭРЯ в 2D условиях роста.

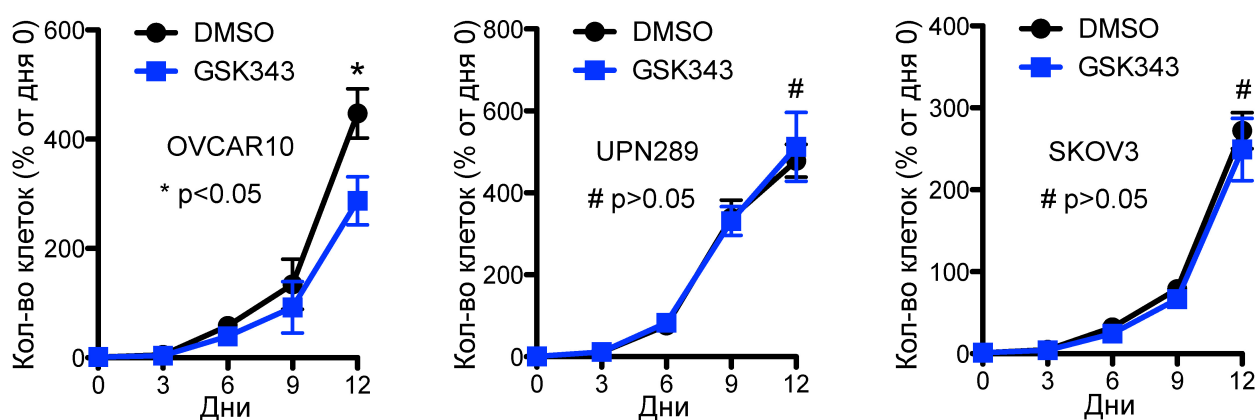


Рисунок 8. Пролиферация указанных клеток ЭРЯ в стандартных двумерных (2D) условиях роста с добавлением GSK343 или контроля (DMSO).

### 1.8 Ингибирование активности EZH2 в клетках ЭРЯ подавляет их рост в трехмерных условиях культивирования

Хорошо известно, что микросреда опухоли и внеклеточный матрикс играют важную роль в регуляции фенотипа опухоли, частично посредством эпигенетических механизмов [Weaver, Gilbert, 2004]. Поэтому был использован

метод роста клеток в 3D условиях в Matrigel™ (растворимая смесь компонентов базальной мембраны). В данных условиях рост клеток ЭРЯ с добавлением GSK343 подавлялся, что выражалось в уменьшении размеров ацинусов, сформированных клетками ЭРЯ (Рисунок 10).

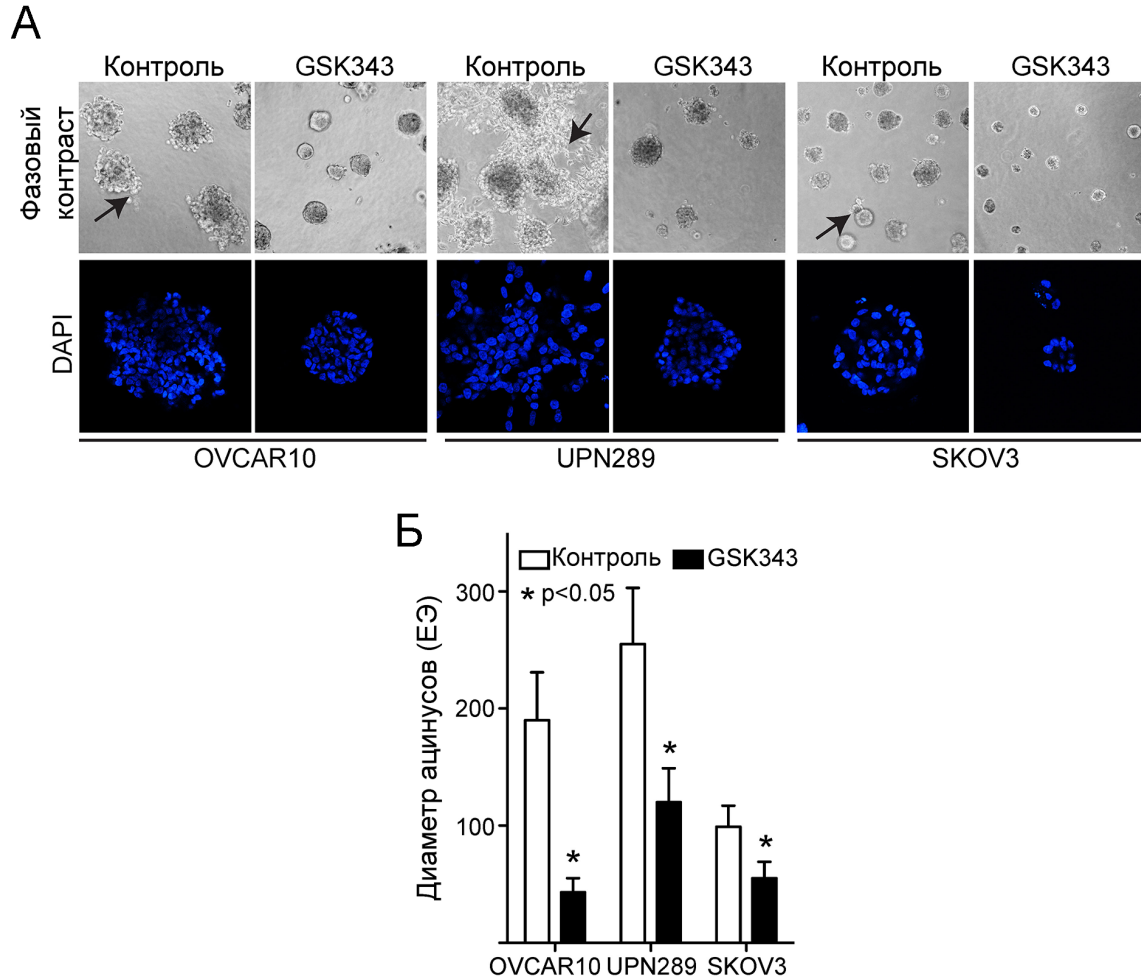


Рисунок 10. А - Микроскопия ацинусов, сформированных указанными клетками ЭРЯ. Изображения сформированных ацинусов представлены в фазовом контрасте, либо с имуннофлуоресцентным красителем для ДНК – DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол). Ацинусы клеток ЭРЯ, обработанных GSK343 имеют меньший диаметр. Б – Результаты измерения диаметров ацинусов.

### 1.10 Ингибитор активности EZH2 вызывает апоптоз в клетках ЭРЯ в трехмерных, но не в двумерных условиях роста

При анализе клеток методом Guava Nexin количество аннексин-V-положительных клеток было увеличено, что свидетельствует об апоптозе, вызванном действием GSK343 на клетки ЭРЯ SKOV3 в 3D условиях роста (Рисунок 11). В отличие от 3D, в 2D условиях ингибирование активности

EZH2 не привело к увеличению аннексин-V-положительных клеток (Рисунок 11Б).

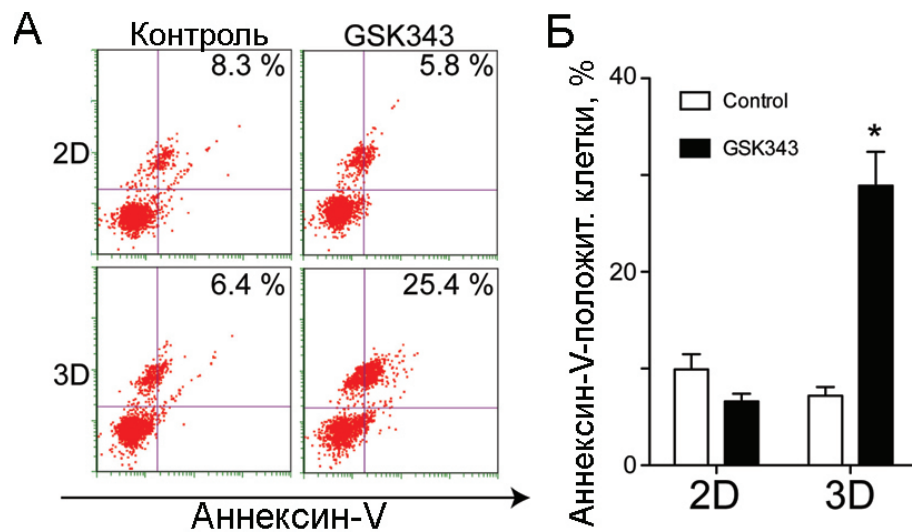


Рисунок 11. Анализ аннексин-V положительных клеток ЭРЯ SKOV3 методом Guava Nexin, обработанных GSK343 или контролем в течение 4 дней в 2D или 3D условиях роста. А – результаты сортировки и анализа аннексин-V-положительных клеток. Б – графическое отображение результатов.

Как указывалось ранее, подавление экспрессии EZH2 вызывает снижение пролиферации и апоптоз клеток ЭРЯ, в том числе в двумерных (2D) условиях культивирования [Li et al., 2010]. При этом основная функция EZH2 - триметилирование лизинового остатка 27 гистона H3 (H3K27me3) [Vire et al, 2006]. Несмотря на это, при подавлении активности EZH2 и эффективной супрессии триметилирования H3K27, при помощи специфического ингибитора GSK343, в клетках ЭРЯ в 2D условиях роста не происходило практически никаких изменений пролиферативной активности или уровня апоптоза. Поэтому можно сделать вывод, что EZH2 обладает другими важными функциями, кроме гистонметилтрансферазной активности.

Наши результаты продемонстрировали, что ингибитор активности EZH2 GSK343 эффективно подавляет пролиферацию клеток и рост ацинусов ЭРЯ в трехмерных (3D) условиях (Рисунок 10). Эти результаты подтверждают ранее описанное влияние EZH2 на внеклеточный матрикс (BM) путем подавления

экспрессии ферментов, регулирующих состояние ВМ в клетках рака предстательной железы [Shin et al., 2012; Varambally et al., 2002]. ВМ играет критически важную роль в регулировании опухолевого роста [Ulrich et al., 2009; Wozniak et al., 2003]. Это объясняет эффективность подавления 3D роста клеток ЭРЯ при ингибировании активности EZH2. Благодаря полученным результатам можно сделать вывод, что гистонметилтрансферазная активность EZH2 играет критическую роль во взаимодействии между опухолевыми клетками и ВМ и формировании инвазивного фенотипа клеток ЭРЯ. При этом результаты демонстрируют, что GSK343 эффективно ингибирует активность EZH2 и подавляет инвазивные характеристики клеток ЭРЯ.

Обнаруженная существенная разница в результатах влияния ингибитора активности EZH2 между 2D и 3D условиями роста указывает на критическую роль выбора модели исследований опухолевого роста. Полученные данные демонстрируют, что ВМ является потенциальной мишенью для терапии опухолей. Они также указывают на то, что GSK343 может являться основой для разработки новых методов терапии ЭРЯ.

### **3.11 Биназа подавляет жизнеспособность клеток ЭРЯ**

Ранее было показано, что биназа селективно ингибирует рост раковых клеток, экспрессирующих онкогены, такие как RAS, AML-ETO, FLT-ITD и др. [Ilinskaya et al., 2001; Ilinskaya et al., 2007; Mitkevich et al., 2013; Mitkevich et al., 2011]. Поэтому было решено проверить действие биназы на клетках ЭРЯ, так как в клетках ЭРЯ гиперэкспрессирована гистонметилтрансфераза EZH2, которая обладает онкогенными свойствами [Karanikolas, 2009].

Для оценки действия биназы на жизнеспособность клеток ЭРЯ и нормальных клеток HOSE использовали колориметрический метод WST-1. Результаты показали значительную цитотоксичность биназы по отношению к клеткам ЭРЯ в сравнении с нормальными клетками HOSE. Жизнеспособность клеток ЭРЯ SKOV3 уже через 24 часа снизилась почти вдвое при минимальной концентрации биназы 10 мкг/мл. При этом подавление жизнеспособности

нормальных клеток HOSE по сравнению с клеточными линиями ЭРЯ минимально.

Цитотоксичность биназы в отношении клеток ЭРЯ имела дозозависимый эффект, но отличалась между клеточными линиями ЭРЯ - SKOV3 и OVCAR5. Чувствительность клеток OVCAR5 была на порядок ниже ( $IC_{50} = 4.0$  мкМ), чем клеток SKOV3 ( $IC_{50} = 1.8$  мкМ). Возможной причиной может быть разница в интернализации РНКазы внутрь клеток [Cabrera-Fuentes et al., 2013; Lee, Raines, 2008] или различная экспрессии микроРНК, расщепленных РНКазой [Qiao et al., 2012].

### **3.12 Биназа индуцирует апоптоз в клетках ЭРЯ и не влияет на экспрессию EZH2**

Анализ апоптоза клеток методом Guava Nexin показал, что минимальная концентрация биназы (10 мкг/мл) вызывает апоптоз на уровне 22% и 16% в клетках ЭРЯ SKOV3 и OVCAR5, соответственно. При более высоких концентрациях биназы (50 и 150 мкг/мл) уровень апоптоза достигал 60% (SKOV3) и 49% (OVCAR5). При этом уровень экспрессии EZH2, и маркера его активности – H3K27me3 остались прежними. В отличие от клеток ЭРЯ, в нормальных клетках HOSE апоптоз не превышал 22% при максимальной концентрации биназы. Таким образом, можно сделать вывод, что биназа вызывает апоптоз в клетках ЭРЯ человека, не изменяя уровень экспрессии и активности EZH2.

Несмотря на весь прогресс в оценке избирательной цитотоксичности биназы, факторы, способствующие избирательной цитотоксичности биназы в отношении клеток ЭРЯ, остаются не изученными. Тем не менее, наши результаты демонстрируют, что биназа обладает большим терапевтическим потенциалом относительно ЭРЯ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые было осуществлено исследование, направленное на выявление механизма регуляции экспрессии гена *EZH2*. Этот ген кодирует гистонметилтрансферазу, критичную для триметилирования лизина 27 гистона H3. Мы установили, что за гиперэкспрессию *EZH2* отвечает не амплификация гена, а регуляция транскрипционным фактором NF- $\kappa$ B. Два CCAAT сайта в проксимальной части промотора гена *EZH2* ответственны за связывание с субъединицей A транскрипционного активатора NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B<sub>A</sub>). Введение мутаций в данные сайты связывания показало, что именно они являются критически важными для экспрессии *EZH2*. Нами впервые выявлена положительная корреляция экспрессии NF- $\kappa$ B<sub>A</sub> и *EZH2*. Сравнение уровня экспрессии NF- $\kappa$ B<sub>A</sub> и *EZH2* по базе данных GEO (Gene Expression Omnibus, NIH, США) выявило, что высокий уровень NF- $\kappa$ B<sub>A</sub> связан с низкой выживаемостью и плохим прогнозом пациентов с ЭРЯ. При анализе наших экспериментальных данных установлено, что подавление экспрессии NF- $\kappa$ B<sub>A</sub> снижает экспрессию *EZH2* и вызывает апоптоз клеток ЭРЯ *in vitro* и в ксенографтах мышей и что эктопическая экспрессия *EZH2* подавляет апоптоз, вызванный нокдауном NF- $\kappa$ B<sub>A</sub>. Было показано, что ингибирование триметилирования лизина 27 гистона H3 вызывает апоптоз в клетках ЭРЯ в режиме выращивания клеток в матриксе, образующем трехмерную структуру (3D). В двумерной (2D) системе роста клеток апоптоз-индуцирующее действие не проявляется. Считаем нужным обратить внимание, что выявленные различия эффектов, проявляющихся в режиме 2D и 3D имеют принципиальное значение для тестирования новых препаратов на основе ингибиторов *EZH2* и для перспектив разработки эффективных терапевтических агентов. В отношении изучения апоптоз-индуцирующего действия РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) с установленными ранее противоопухолевыми эффектами по отношению к ряду раковых клеток, нами впервые было показано селективное действие этого фермента в отношении клеток ЭРЯ в сравнении с нормальными эпителиальными клетками яичника.

Таким образом, основные выводы по настоящей работе можно сформулировать следующим образом:

- 1) Транскрипционный фактор NF-Y регулирует экспрессию гена гистонметилтрансферазы *EZH2* в клетках эпителиального рака яичников, связываясь с двумя ССААТ сайтами в проксимальной части промотора *EZH2*.
- 2) Экспрессия регуляторной субъединицы А транскрипционного активатора NF-Y (NF-YA) и гистонметилтрансферазы *EZH2* коррелируют в нормальных и опухолевых эпителиальных тканях яичников.
- 3) Нокдаун регуляторной субъединицы NF-YA подавляет экспрессию *EZH2* и вызывает апоптоз в клетках эпителиального рака яичников.
- 4) Подавление активности гистонметилтрансферазы *EZH2* селективным ингибитором GSK343 снижает уровень пролиферации, инвазивность и вызывает апоптоз клеток эпителиального рака яичников в трехмерных, но не двумерных условиях роста.
- 5) Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* (биназа) селективно ингибирует жизнеспособность клеток эпителиального рака яичников, вызывая апоптоз, но не изменяя уровень экспрессии *EZH2*.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных изданиях, включенных в список ВАК:

- 1) **Garipov, A.** Three-dimensional culture sensitizes epithelial ovarian cancer cells to *EZH2* methyltransferase inhibition / A. Garipov, M. D. Amatangelo, H. Li, J. R. Conejo-Garcia, D. W. Speicher, R. Zhang // *Cell Cycle*. – 2013. – Vol. 12. – P. 2113-2119.
- 2) **Garipov A.** NF-YA underlies *EZH2* upregulation and is essential for proliferation of human epithelial ovarian cancer cells / A. Garipov, H. Li H, B. G. Bitler, R. J. Thapa, S. Balachandran, R. Zhang // *Molecular Cancer Research*. – 2013. – Vol. 11. – P. 360-369.
- 3) **Garipov, A. R.** *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces apoptosis in human ovarian cancer cells / A. R. Garipov, A.R., A. A. Nesmelov, H. A. Cabrera-Fuentes, O. N. Ilinskaya // *Toxicon*. – 2014. – Vol .92. – P. 54-59.
- 4) Bitler, B. G. Synthetic lethality by targeting *EZH2* methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers / B. G. Bitler, K. M. Aird, **A. R. Garipov**, H. Li,

M. Amatangelo, A. Kossenkov, D. C. Schultz, L. Shih, J. R. Conejo-Garcia, D. W. Speicher, R. Zhang // *Nature Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – P. 231-238.

### **Тезисы в сборниках материалов конференций:**

1) Гарипов, А. Р. Оценка эффективности ингибитора активности гистонметилтрансферазы EZH2 в клетках эпителиального рака яичников / А. Р. Гарипов, О. Н. Ильинская // I Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – 2015. – С. 23-24.

2) Garipov, A. Transcriptional regulation of EZH2 and its role in epithelial ovarian cancer / A. Garipov, R. Zhang // Fox Chase Cancer Center 16th annual research conference. – 2011. – P. 28.

3) Garipov, A. Three-dimensional culture sensitizes epithelial ovarian cancer cells to EZH2 methyltransferase inhibition / A. Garipov, R. Zhang // Fox Chase Cancer Center 17th annual research conference. – 2011. – P. 39.

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному руководителю, зав. кафедры микробиологии КФУ, д.б.н., профессору Ольге Николаевной Ильинской, а также коллегам из институтов Fox Chase Cancer Center и Wistar Institute (США): Dr. Rugang Zhang, Dr. Maureen Murphy, Dr. Benjamin Bitler, Dr. Katherine Aird, Dr. Michael Amatangelo, Dr. Hua Li, Dr. Ilya Seribriiskii.

Автор благодарит всех преподавателей и сотрудников кафедры микробиологии КФУ.

Е-mail адрес автора: garipov.azat@gmail.com

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01, e-mail: ziabramova@mail.ru